

⑱ 公開特許公報 (A)

昭62-46260

⑲ Int.Cl.⁴G 01 N 31/22
33/52

識別記号

121

府内整理番号

8506-2G
8305-2G

⑳ 公開 昭和62年(1987)2月28日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

㉑ 発明の名称 多層分析素子

㉒ 特願 昭60-187160

㉓ 出願 昭60(1985)8月26日

㉔ 発明者 神山 幹夫 日野市さくら町1番地 小西六写真工業株式会社内

㉕ 発明者 小林 守夫 日野市さくら町1番地 小西六写真工業株式会社内

㉖ 出願人 小西六写真工業株式会社 東京都新宿区西新宿1丁目26番2号
社

㉗ 代理人 弁理士 市之瀬 宮夫

明細書

1. 発明の名称

多層分析素子

2. 特許請求の範囲

液体不浸透性でかつ、光透過性の支持体上に、親水性ポリマー層および多孔性展開層を有する多層分析素子において、前記親水性ポリマー層は、主として高分子重合体粒子の芯部に疎水性モノマーの繰返し単位を、主として高分子重合体粒子の外殻部に親水性モノマーの繰返し単位を有する高分子重合体から形成されることを特徴とする多層分析素子。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、流体試料中の特定成分を定量するための多層分析素子に関する。

[発明の背景]

近年、生物学的流体試料中の、特定成分を分析する方法が多数開発されてきている。特に臨床医学の分野では種々の分析機器が開発され、多くの

病院の臨床検査室等に導入されている。この中でも特公昭53-21677号明細書に開示された多層分析素子はその操作の簡便性、高い定量性から注目されている。

【~~マニフェスト・マニピュレーターの基本的な構成として~~
は

水

層

For 10/647, 9/3

物

親

る

か

しないように硬膜剤によりゼラチンは硬膜されている。

しかしながら、例えば尿酸やアルカリフォスファターゼ等のように高いpHであったり、あるいは高pHの緩衝剤の使用が不可欠の場合は、原理的には親水性ポリマーとしてゼラチンが用いられ

るとしても、硬膜が困難であって実用的でない。また、例えば総蛋白質やアルブミン等、あるいは測定原理の点からゼラチンを親水性ポリマーとして用いることができない場合があり、この場合、親水性ポリマーとしてポリアクリルアミドやポリビニルピロリドン等を用いることが考えられるが、これらはゼラチンとは異なり硬膜が難しい欠点がある。

従って、分析対象成分が上記の如く尿酸やアルカリフォスファターゼ等のように高いpHであったり、あるいは高いpHの緩衝剤の使用が不可欠で、その際の硬膜剤の使用が著しく困難な場合においても、さらに分析対象成分が総蛋白質やアルブミン等のように親水性ポリマーとしてゼラチンが用いられない場合においても、親水性ポリマー層が経時や熱により変化せず、該層の膨潤特性、分析対象成分の浸透が均一になるような多層分析系子の開発が望まれていた。

[発明の目的]

本発明は上記の点に鑑み為されたものであり、

て高分子重合体粒子の外殻部に親水性モノマーの繰返し単位を有する高分子重合体から形成される多層分析系子により達成される。

[発明の具体的構成]

本発明の多層分析系子において用いられる支持体は、液体不浸透性でかつ、光透過性の支持体（以下、本発明の支持体という）であれば、その種類を問わないが、例えば酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、またはポリスチレンのような種々の重合体材料が、この使用目的に適する。この場合の上記支持体の厚さは任意であるが、好ましくは約50ミクロンから250ミクロンである。また、本発明の支持体の観察側の一側面は、その目的に応じて任意に加工することは可能である。上記の支持体上に本発明に用いられる親水性ポリマー層を設ける場合、直接被覆することもできるが、場合によっては、光透過性の下塗り層を使用して親水性ポリマー層と支持体との間の接着性を高めることは効果的である。

本発明の第1の目的は、分析対象成分が尿酸やアルカリフォスファターゼ等のように硬膜剤の使用が著しく困難な場合においても、さらに分析対象成分が総蛋白質やアルブミン等のように親水性ポリマーとしてゼラチンが用いられない場合においても良好な分析結果を与える多層分析系子を提供することにある。

本発明の第2の目的は、親水性ポリマー層が経時や熱により変化せず、該層の膨潤特性、分析対象成分の浸透が均一である多層分析系子を提供することにある。

本発明の第3の目的は、呈色領域内の発色均一性が良好で、分析結果の同時再現性に優れた多層分析系子を提供することにある。

[発明の構成]

本発明の上記目的は、液体不浸透性でかつ、光透過性の支持体上に、親水性ポリマー層および多孔性展開層を有する多層分析系子において、前記親水性ポリマー層は、主として高分子重合体粒子の芯部に疎水性モノマーの繰返し単位を、主とし

て次に、本発明の多層分析系子に用いられる親水性ポリマー層について説明する。

本発明において、親水性ポリマー層に用いられる、主として高分子重合体粒子の芯部に疎水性モノマー単位を含み、主として高分子重合体粒子の外殻部に親水性モノマー単位を含む高分子重合体（以下、本発明の高分子重合体といふ）は、疎水性モノマーと親水性モノマーとを共重合させて得られる。

本発明に用いられる疎水性モノマーとしては、ステレン、メチルステレン等のステレン類、炭素原子数1乃至4のアルキル基を有するアクリル酸エステル類およびメタアクリル酸エステル類、塩化ビニル、塩化ビニリデン、アクリロニトリル、メタアクリロニトリル等が挙げられる。

本発明に用いられる親水性モノマーとしては、アクリルアミド、イソプロピルアクリルアミド等のアクリルアミド類、メタアクリルアミド、イソプロピルメタアクリルアミド等のメタアクリルアミド類、N-ビニルビロリドン及びその誘導体、

ビニルアルコール（但し酢酸ビニルを重合後加水分解をして得る）、ヒドロキシエチルアクリレート等の親水性基置換アクリレート類、ヒドロキシエチルメタアクリレート等の親水性基置換メタアクリレート類、アクリル酸、メタアクリル酸及びその塩等が挙げられる。

上記疎水性モノマーおよび親水性モノマーは各々1つ以上を共重合させることができる。

本発明の高分子重合体において、親水性モノマー単位は約9.9wt%から約7.5wt%が好ましく、より好ましくは約9.7wt%から約8.0wt%であり、疎水性モノマー単位は約2.5wt%から約1wt%が好ましく、より好ましくは約2.0wt%から約3wt%である。

本発明の高分子重合体を得るために重合反応は、上記疎水性モノマーおよび親水性モノマーを水中に添加し、搅拌を行いつつ温度を上げ、水溶性重合開始剤（例えば、過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウム等）を加えて一定時間重合を行なわせれば良い。

発明の高分子重合体により皮膜を形成して本発明の親水性ポリマー層として用いた場合、硬膜処理を施したと同様の効果が得られる。

本発明の高分子重合体においては、親水性ポリマーの皮膜層を形成し得る重合度を有すればその重合度には特に制限はなく、また、本発明の高分子重合体粒子の粒径等にも特に制限はない。

本発明の高分子重合体の具体例を以下に示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

例示高分子重合体

1. アクリルアミド／メチルメタアクリレート共重合体 (重量比9.5:5)
2. アクリルアミド／メチルメタアクリレート共重合体 (重量比9.0:1.0)
3. アクリルアミド／n-ブチルアクリレート共重合体 (重量比9.5:5)
4. アクリルアミド／n-ブチルアクリレート共重合体 (重量比9.0:1.0)
5. アクリルアミド／メチルアクリレート共重合体 (重量比8.5:1.5)

更に別の重合方法としてはブロック共重合法や、グラフト共重合法も用いることが出来る。この場合は疎水性モノマー単位と、親水性モノマー単位は、ポリマーセグメント内ではっきり分かれたものとなる。

前記、親水性モノマーと疎水性モノマーを共重合させた本発明の高分子重合体は水溶液中で、主として芯部に疎水性モノマーの繰返し単位を、主として外殻部に親水性モノマーの繰返し単位を含む粒状構造（以下、本発明の高分子重合体粒子ともいう）をとり、これを層として皮膜状態にした場合、熱あるいは経時によっても変化しない安定な皮膜を形成する。従って、本発明の高分子重合体を多層分析素子の親水性ポリマー層に用いた場合、本発明の高分子重合体粒子において、主として芯部に疎水性モノマーの繰返し単位を含むことにより、芯部の水に対する親和性が過度になることはなく、さらに主として外殻部に親水性モノマーの繰返し単位を含むことにより水に対して適度に膨潤して分析対象成分の浸透が均一となり、本

6. メタアクリルアミド／メチルメタアクリレート共重合体

(重量比8.0:2.0)

7. メタアクリルアミド／メチルアクリレート共重合体 (重量比7.5:2.5)

8. アクリルアミド／スチレン共重合体 (重量比9.5:5)

9. アクリルアミド／アクリロニトリル共重合体 (重量比9.0:1.0)

10. イソプロピルアクリルアミド／メチルメタアクリレート共重合体 (重量比9.0:1.0)

11. N-ビニルビロリドン／メチルメタアクリレート共重合体 (重量比9.5:5)

12. N-ビニルビロリドン／メチルアクリレート共重合体 (重量比9.0:1.0)

13. N-ビニルビロリドン／n-ブチルアクリレート共重合体 (重量比9.5:5)

14. N-ビニルピロリドン／スチレン共重合体 (重量比90:10)
15. N-ビニルピロリドン／アクリロニトリル共重合体 (重量比85:15)
16. N-ビニルピロリドン／塩化ビニリデン共重合体 (重量比90:10)
17. ビニルアルコール／スチレン共重合体 (重量比95:5)
18. ヒドロキシエチルアクリレート／メチルメタアクリレート共重合体 (重量比90:10)

本発明の高分子重合体の代表的合成例を以下に示す。

合成例 (例示化合物1. の合成)

攪拌装置、温度計、窒素導入管を付けた2ℓの三頭フラスコに、脱気した蒸留水1ℓ及び精製したアクリルアミド 105.45gを入れ十分攪拌し溶解した。この後、蒸留液のメチルメタアクリレート 5.55gを添加し、攪拌をつづけながら、内温を70℃まで昇温した。更に50mlの蒸留水に

1.1gの過硫酸カリウムを溶解した溶液を反応液に添加後、窒素気流下24時間反応を行なった後、室温まで冷却し、10重量%に固型分を調整した後、B型回転粘度計N0.2ローターを12 rpmで粘度測定をした。粘度は12300センチボイスであった。

本発明の高分子重合体を含む溶液を、液体不透過でかつ、光透過性の支持体上に塗布し、本発明の親水性ポリマー層を形成する方法については通常の塗布方法がすべて適用でき、例えばエアドクター塗布法、ブレード塗布法、スライドホッパー塗布法、浸漬塗布法、カーテン塗布法等種々の公知の方法を用いることができる。

本発明の親水性ポリマー層の膜厚としては、乾燥膜厚として、一般に約5ミクロンから約50ミクロンが好ましく、より好ましくは約10ミクロンから約30ミクロンの範囲である。

本発明によれば、本発明の支持体上に前記本発明の親水性ポリマー層及び多孔性展開層を順次積層して、本発明の多層分析素子とされる。

本発明の多層分析素子に適用できる多孔性展開層としては、本発明の支持体上に設けられた親水性ポリマー層上に直接または間接に1層または複数層設けられる。

この多孔性展開層は、

(1) 一定容積の生物学的流体試料を単位面積当たり一定容積に親水性ポリマー層内に均一に配布する機能を有すればよいが更に必要に応じて、

(2) 生物学的流体試料中の分析反応を阻害する物質または要因を除去する機能を有し、更には

(3) 例えば分光光度分析を行なう際には支持体をへて透過する測定光を反射するバックグラウンド作用を行なう機能を併有してもよい。

本発明に用いられる多孔性展開層は、一つで上記3つの機能を全て兼ねそなえてもよいし、また3つの機能を適宜分離し、各機能毎に別の層を使用することも可能である。

更に、3つの機能のうち、2つの機能を有する層と、残りの他の機能を有する層を組合わせ使用することもできる。

上記本発明に用いられる多孔性展開層の膜厚は、目的に応じて任意に選ぶことができるが、好ましくは約30ミクロン乃至約600ミクロンであり、更に好ましくは約50ミクロン乃至約600ミクロンである。

本発明に用いられる多孔性展開層は特公昭53-21677号記載のブラッシュ・ポリマー層、特開昭55-164356号記載の親水化処理された繊維、特開昭57-197466号記載のバラバラの繊維と反応性基を含む高分子重合体の混合物から成る多孔性層、特開昭55-90859号記載のポリマービーズと接着剤から成る粒状構造物、特開昭57-101760号及び同57-101761号記載の反応性基を有するポリマービーズが低分子化合物を介して又は直接結合した粒子結合体等を挙げる事が出来る。

特に特開昭57-197466号記載のバラバラの繊維と反応性基を有する高分子重合体から成る多孔性層は製造が容易でかつ、すぐれた性能を有するものである。

本発明に用いられる多孔性展開層を形成する系

材としては天然のセルロース、あるいはその誘導体、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド等の合成繊維が挙げられ、該層はこれら天然、合成を問わず各種繊維がランダムに三次元的からみ合いによって構成されたものが挙げられる。

さらに、上記多孔性展開層形成素材として任意のサイズのものを単独もしくは複数以上選ぶことが出来るが、JIS標準フルイで50メッシュ～325メッシュ、好ましくは100～320メッシュ、さらに好ましくは200～300メッシュのものが挙げられる。

本発明の多層分析素子においては、通常、前記本発明の親水性ポリマー層に生物学的流体試料中の特定成分と定量反応を行なわせる反応試薬類を含有させて用いられる。この反応試薬類は分析対象成分に応じて任意に選択される。

これらの反応試薬類としては、分析対象成分がアルブミンの場合、プロモクレゾールグリーン及びpH約3.0乃至約6.5、好ましくはpH約3.0乃至4.5の緩衝剤（例えばリンゴ酸、乳酸、コハ

ク酸、マロン酸、クエン酸等の酸と塩基の組合せによる）が含まれる。また、呈色指示薬であるプロモクレゾールグリーンは多孔性展開層に含有する事は可能である為、この際の上記親水性ポリマー層中には前記緩衝剤のみが含有される。

総蛋白質測定の場合、ピュレット試薬組成物、即ち水溶性第二銅塩（典型的には硫酸第二銅）、銅キレート化剤（典型的にはロッシェル塩）及び使用条件下でpHを約12.0以上にするに十分な量の塩基（例えばNaOH、LiOH等）が含有される。

尿酸を測定する場合には、ウリカーゼ、ペルオキシダーゼ及び過酸化水素との相互作用により検知可能な変化を示す化合物（例えば、1,7-ジヒドロキシナフタレンと4-アミノアンチビリンの組合せ、特開昭55-124499号記載のロイコ色素、特開昭57-94658号記載の耐塩性フェノール化合物等）及びpHが約8.5乃至約9.5にするための緩衝剤（例えば、ホウ酸緩衝剤）が含有される。

又、アルカリリフォスファターゼを測定する場合

には、pHが約9.5乃至約10.5にする為の緩衝剤（例えば、炭酸塩緩衝剤）のみが該親水性ポリマー層に含有され基質であるD-ニトロフェニルリシン酸は多孔性展開層又は他の別異の層に含有される。

本発明の親水性ポリマー層に含有される反応性試薬類は、生物学的流体試料中の分析対象成分及びこの成分を分析するために選択した分析反応によって決まることは言うまでもない。また、選ばれた分析反応が二種以上の試薬から構成されている場合、この試薬を一つの親水性ポリマー層内に一緒に混合して含有させても、また、二種以上の試薬を二つ以上の親水性ポリマー層として含有させてもよい。これらは分析反応自体の作用機構によって決定されることもあり、好ましくない影響を及ぼさない限りにおいて、その構成は任意である。

一方、試料中の二種以上の分析対象成分を、同一の親水性ポリマー層内で分析反応を行なうこととは可能である。この際、二種以上の分析反応は相

互に他を妨害しないように、また、生成した反応生成物を測定する際、同様に互いに他に影響を及ぼさないよう分析反応を選択する必要がある。

また、上記反応試薬類は、必要に応じて多孔性展開層に適宜含有する事が出来る。

本発明の多層分析素子においては、目的に応じて多孔性展開層、親水性ポリマー層に、酸、アルカリ、塩、緩衝剤、解離剤、界面活性剤等を適宜含有させることができる。

本発明に用いられる酸又は緩衝剤としては、例えば脂肪族ヒドロキシカルボン酸（例えば、グリコール酸、乳酸、 α -ヒドロキシ酪酸、クリセリン酸、タルトロン酸、りんご酸、酒石酸、くえん酸）、脂肪族ジカルボン酸（例えばマロン酸、こはく酸、3,3-ジメチルグルタル酸、 α , α' -ジメチルグルタル酸）、脂肪族カルボン酸（例えば酢酸、アロビオン酸、酪酸）、これらの塩と上記酸の組み合わせによる緩衝剤などが挙げられる。

好ましい酸又は酸とそれ自身の塩とを共に用い

る緩衝剤としては、リンゴ酸、乳酸、コハク酸、マロン酸、クエン酸、酒石酸等が挙げられる。

本発明に用いることのできる界面活性剤としては、例えばアルキルフェノキシポリエトキシエタノール〔例えばトリトン[®] X-100(ロームアンドハース社製)〕、ポリエチレンオキシドアルキルエステル〔例えばエマルゲン-120(花王アトラス社製)〕、アルキルフェノキシグリセリン〔例えばサーファクタント10G(オリーン社製)〕が代表的な例として挙げられる。

本発明の多層分析素子には、所望に応じて種々の機能の層及び層構成をとる事が可能である。例えば、米国特許第3,992,158号記載の試薬層、反射層、下塗り層、米国特許第4,042,335号記載の放射線ブロッキング層、米国特許第4,066,403号記載のバリヤー層、米国特許第4,144,306号記載のレジストレーション層、米国特許第4,166,093号記載のマイグレーション阻止層、米国特許第4,127,499号記載のシンチレーション層、特開昭55-90859号記載のスカベンジャー層および米国

特許第4,110,079号記載の破壊性ポッド状部材等を任意に組み合わせて本発明の目的に合わせた多層分析素子を構成することが可能である。

上記の種々の層は、従来写真工業において公知のスライドホッパー塗布法、押出し塗布法、浸漬塗布法等を隨時用いることで任意の膜厚の層を塗布することが可能である。

また、層構成としては、例えば特公昭58-18628号、米国特許第4,110,079号、特開昭58-131565号等に記載されている層構成を任意に選択する事が可能である。

このようにして製造された多層分析素子は、分析方法に依存して種々の形状にする事が可能である。例えば所望の中の伸長テープ、シート又はプラスチックマウントに装着されたスライドを含む種々の形状にする事が出来る。

本発明の多層分析素子に適用される流体試料としては例えば、血清(血漿・血清を含む)、リンパ液、尿等の生物学的流体試料が挙げられる。又、用いる流体試料の量は任意であるが、好ましくは

約5μl乃至50μlであり、更に好ましくは約5μl乃至約20μlである。通常約10μlの流体試料を適用することが好ましい。

また、必要により30℃～50℃、好ましくは35℃～40℃で1～20分、好ましくは1～10分程度インキュベーションを行った後、液体不透過性でかつ、光透過性の支持体側から500～650nmの範囲の光のうちで条件に応じた適宜な波長の光を通過させるフィルターを通して反射光学濃度を測定し、検量線から濃度を求めるべし。また、あらかじめ色見本を作成しておき、視覚的に比較することにより半定量的な測定を行うこともできる。

[発明の具体的効果]

以上説明した如く、本発明の多層分析素子においては、分析対象成分が尿酸やアルカリフォスファターゼ等のように硬膜剤の使用が著しく困難な場合においても、さらに分析対象成分が総蛋白質やアルブミン等のように親水性ポリマーとしてゼラチンが用いられない場合においても、親水性ボ

リマー層が経時や熱により変化せず、該層の透過程特性、分析対象成分の浸透が均一となり、分析結果の同時再現性に優れた多層分析素子を提供することができた。,

[発明の具体的実施例]

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の実施の態様がこれらに限定されるものではない。

実施例-1

透明な下引き済みの膜厚180ミクロンのポリエチレンテレフタレート支持体上に下記の組成の塗布液を順次積層しアルブミン用多層分析素子試料(No.1～7)を作成した。

(親水性ポリマー層)

下記表-1に示す本発明の高分子重合体及び比較高分子重合体の10%水溶液35g、エマルゲン120(ノニオン界面活性剤、花王アトラス(株)製)50%水溶液5mlを加えた溶液にさらにクエン酸25gを加え、搅拌し溶解した後、この液に水酸化ナトリウム30%水溶液を加えてpH3.7

に調整した後に蒸留水で50mlにし、間隔250ミクロンのドクターブレードコーラーを用いて上記下引き済み膜厚180ミクロンのポリエチレンテレフタレート支持体上に塗布し乾燥（乾燥膜厚25ミクロン）を行なった。

（多孔性展開層）

キシレン84mlにトリトン[®] X-100-ノニオン界面活性剤、ロームエンドハース社製）3.0g、スチレン／グリシジルメタアクリレート共重合体（重合比9:1）4.5gを溶解した後に、更にブロモクレゾールグリーン0.585gを添加し、ガラスピーズを入れ、サンドスターラーで5時間分散を行なった後、ガーゼでろ過し、ガラスピーズと分散液をろ別しこの分散液30mlに対し、濾紙粉末C（東洋滤紙（株）製、300メッシュ以上）を10.5g添加、搅拌し、超音波分散を行なった後、この分散液を375ミクロンの間隔を有するドクターブレードコーラーを用い、前記親水性ポリマー層上に塗布を行ない、乾燥（乾燥膜厚180ミクロン）した。

上記本発明のアルブミン用多層分析素子試料（N0.1～5）及び比較アルブミン用多層分析素子試料（N0.6、7）に対して種々の既知濃度のヒト血清アルブミン水溶液の10μlを展開層上に滴下し、37℃7分間インキュベーションを行なった後、サクラ光電濃度計PDA-65（小西六写真工業（株）製）を用い、545nmのフィルターで反射濃度を測定した後、アルブミン濃度と反射濃度から検量線を作成した。

更に、ヒト血清アルブミン濃度が、それぞれ3.5g/dl、5.5g/dl、7.2g/dlのアルブミン水溶液を用意し、各溶液を各々の分析素子に対してn=10で同様に滴下し、37℃7分間インキュベーションを行なった後、反射濃度をもとめ前記の各々の検量線に当てはめアルブミン濃度を算出し、同時再現性の評価を行なった。結果を表-2に示す。

なお表-2において、 \bar{x} は平均値であり、SDは標準偏差、CVは次式で表わされる同時再現性である。

表-1
親水性ポリマー層に使用した高分子重合体

試験No.	例示高分子重合体	（1）アクリルアミド／メチルメタアクリレート共重合体 (重合比9.5:5)
2 (本発明)	例示高分子重合体	（2）アクリルアミド／メチルメタアクリレート共重合体 (重合比9.0:1.0)
3 (本発明)	例示高分子重合体	（3）アクリルアミド／スチレン共重合体 (重合比9.5:5)
4 (本発明)	例示高分子重合体	（4）N-ビニルビロドシン／アクリロニトリル共重合体 (重合比8.5:1.5)
5 (本発明)	例示高分子重合体	（5）ヒドロキシエチルアクリレート／メチルメタクリレート共重合体 (重合比9.0:1.0)
6 (比較)	ポリアクリルアミド	（商品名ポリアクリロンSF13、ハマノ工業（株）製） (重合比9.0:1.0)
7 (比較)	ポリ-N-ビニルビロドシン	（商品名コリドンK-90、BASF社製）

$$CV \text{ (同時再現性)} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

以下余白

上記表-2から明らかな如く、本発明のアルブミン用多層分析素子試料（No.1～5）は、同時再現性が、アルブミンが低濃度で3%台、高濃度で1%台と良好な結果を示しているが、比較のアルブミン用多層分析素子試料（No.6,7）では低濃度で6%台、高濃度で3%台と大きな値を示している。

以上明らかなように、本発明の高分子重合体を用いた多層分析素子が良好な性能を有していることがわかる。

実施例-2

透明な下引き滴みの膜厚180ミクロンのポリエチレンテレフタレート支持体上に下組成の反応試薬類を含む親水性ポリマー層を塗布し、蛍蛋白質分析用多層分析素子を作成した。

（親水性ポリマー層）

本発明の高分子重合体及び比較重合体
(10%水溶液、詳細は第3表) 264g
酒石酸カリウムナトリウム4水和物

54.7g

		ヒト血清アルブミン濃度		
		3.5 g/dL	5.5 g/dL	7.2 g/dL
1 (本発明)	\bar{x}	3.513 g/dL	5.496 g/dL	7.190 g/dL
	SD	0.112	0.162	0.120
	CV	3.19 %	2.95 %	1.67 %
2 (本発明)	\bar{x}	3.526 g/dL	5.519 g/dL	7.213 g/dL
	SD	0.103	0.148	0.112
	CV	2.92 %	2.68 %	1.55 %
3 (本発明)	\bar{x}	3.495 g/dL	5.488 g/dL	7.206 g/dL
	SD	0.122	0.166	0.116
	CV	3.49 %	3.02 %	1.61 %
4 (本発明)	\bar{x}	3.583 g/dL	5.543 g/dL	7.234 g/dL
	SD	0.124	0.173	0.126
	CV	3.46 %	3.12 %	1.74 %
5 (本発明)	\bar{x}	3.489 g/dL	5.518 g/dL	7.199 g/dL
	SD	0.114	0.158	0.121
	CV	3.27 %	3.06 %	1.68 %
6 (比較)	\bar{x}	3.533 g/dL	5.506 g/dL	7.215 g/dL
	SD	0.226	0.215	0.253
	CV	6.40 %	3.90 %	3.51 %
7 (比較)	\bar{x}	3.481 g/dL	5.445 g/dL	7.114 g/dL
	SD	0.238	0.238	0.268
	CV	6.84 %	4.37 %	3.76 %

硫酸銅5水和物 20g
水酸化ナトリウム 27.2g
5%アルカノールXC水溶液 6.6g
(アニオン性界面活性剤、デュポン社製)

これに水を加えて460gとする

この塗布液を間隙が250ミクロンのドクターブレードコーティング機を用いて上記支持体上に塗布し、乾燥（乾燥膜厚30ミクロン）した。

さらに、上記反応試薬類を含有した親水性ポリマー層の上に、下記に示す多孔性展開層を間隙500ミクロンのドクターブレードコーティング機を用いて積層し、乾燥（乾燥膜厚200ミクロン）させた。

(多孔性展開層)

遠紙粉末D（東洋遠紙（株）製
40から100メッシュ） 91g
スチレン/グリシジルメタアクリレート共重合体
(重量比90:10) 22.75g
トリトン[®]X-100
(ロームアンドハース社製) 9.1g

キシレン 280g

反応試薬類を含有した親水性ポリマー層に用いた本発明の例示高分子重合体及び比較高分子重合体を、以下の表-3に示す。

以下余白

前述の実施例-1と同様に各種濃度のアルブミン水溶液を10mL、各々の多層分析素子試料に滴下し、37℃7分間インキュベーションを行なった後、サクラーデンシットメーター-PDA-65（小西六写真工業（株）製）で545nmのフィルターを用い、反射濃度を測定し検量線を作成した。

更に実施例-1と同様にそれぞれ4.5g/dL、6.5g/dL、8.5g/dLの総蛋白質量になるように調製したウシ血清アルブミン水溶液を用いて、各々の多層分析素子試料にN=10で同様に測定を行なった後、前述の検量線に當てはめ総蛋白質量を算出し、同時再現性の評価を行なった。結果を下記表-4に示す。

以下余白

表-3

		試料No.		
		蛋白質濃度		
		4.5 g/dL	6.5 g/dL	8.5 g/dL
(本発明)	\bar{x}	4.511 g/dL	6.506 g/dL	8.498 g/dL
	SD	0.146	0.172	0.203
(本発明)	CV	3.24 %	2.64 %	2.39 %
	SD	0.131	0.163	0.199
(本発明)	CV	3.04 %	2.51 %	2.34 %
	SD	0.130	0.161	0.198
(本発明)	\bar{x}	4.493 g/dL	6.511 g/dL	8.503 g/dL
	SD	0.132	0.155	0.167
(本発明)	CV	2.94 %	2.38 %	1.98 %
	SD	0.128	0.153	0.176
(比較)	CV	6.40 %	4.57 %	3.98 %
	SD	0.288	0.298	0.336

表-4

		総蛋白質濃度		
		4.5 g/dL	6.5 g/dL	8.5 g/dL
8	\bar{x}	4.511 g/dL	6.506 g/dL	8.498 g/dL
(本発明)	SD	0.146	0.172	0.203
9	\bar{x}	4.503 g/dL	6.500 g/dL	8.501 g/dL
(本発明)	SD	0.131	0.163	0.199
10	\bar{x}	4.493 g/dL	6.511 g/dL	8.503 g/dL
(本発明)	SD	0.132	0.155	0.167
11	\bar{x}	4.500 g/dL	6.523 g/dL	8.478 g/dL
(比較)	SD	0.288	0.298	0.336
	CV	6.40 %	4.57 %	3.98 %

以上表-4に示した如く、本発明の多層分析素子試料（No.8～10）は比較多層分析素子試料（No.11）に比較して良好な性能を有している事が明らかである。

実施例-3

前記実施例-2で用いた、本発明の多層分析素子試料No.8、9、10及び比較多層分析素子試料No.11を用い、これを40℃相対湿度55%の条件で保存を行なった。

まず0日における検量線の前記実施例-2に従い作成した後、総蛋白質量6.5g/dL及び8.5g/dLのアルブミン水溶液をそれぞれ5日目、10日目、15日目、20日目、25日目で各多層分析素子試料に滴下を行ない、得られた反射濃度を0日における検量線に當てはめて総蛋白質量を算出し、0日における総蛋白質量との比をとり、劣化率として示した。

以下余白

$$\text{劣化率} = \frac{\left(\frac{\text{保存における}}{\text{総蛋白質量}} \right) - \left(\frac{\text{0日における}}{\text{総蛋白質量}} \right)}{\left(\frac{\text{0日における総蛋白質量}}{\text{総蛋白質量}} \right)} \times 100 (\%)$$

結果を以下の表-5に示す。

以下余白

		40°C 55%RH保存日数				
		5日	10日	15日	20日	25日
8 (本発明)	6.5 g /d2 (0%)	6.50 g / d2 (- 0.3%)	6.48 g / d2 (- 0.4%)	6.475g / d2 (- 0.4%)	6.360g / d2 (- 2.2%)	6.210g / d2 (- 3.5%)
	8.5 g /d2 (0%)	8.50 g / d2 (0%)	8.49g / d2 (- 0.1%)	8.250g / d2 (- 2.9%)	8.165g / d2 (- 3.9%)	
9 (本発明)	6.5 g /d2 (- 0.2%)	6.49 g / d2 (- 0.2%)	6.485g / d2 (- 0.2%)	6.285g / d2 (- 3.3%)	6.250g / d2 (- 3.8%)	
	8.5 g /d2 (- 0.3%)	8.48 g / d2 (- 0.3%)	8.475g / d2 (- 0.3%)	8.380g / d2 (- 1.4%)	8.275g / d2 (- 2.6%)	
10 (本発明)	6.5 g /d2 (0%)	6.50 g / d2 (0%)	6.495g / d2 (- 0.1%)	6.425g / d2 (- 1.2%)	6.405g / d2 (- 1.5%)	
	8.5 g /d2 (- 0.1%)	8.51 g / d2 (- 0.1%)	8.505g / d2 (+ 0.1%)	8.460g / d2 (- 0.5%)	8.415g / d2 (- 1.0%)	
11 (比較)	6.510g /d2 (0.2%)	6.510g / d2 (0.2%)	6.472g / d2 (- 0.4%)	6.238g / d2 (- 4.1%)	6.023g / d2 (- 7.3%)	5.926g / d2 (- 8.8%)
	8.5 g /d2 (0%)	8.50 g / d2 (- 0.5%)	8.455g / d2 (- 0.5%)	8.105g / d2 (- 4.6%)	7.506g / d2 (- 11.7%)	7.004g / d2 (- 17.6%)

表-5から明らかな如く、本発明の高分子複合体を親水性ポリマー層に適用した総蛋白質分析用多層分析素子試料（No.8～10）は、40°C、55%RHの条件下に保存を行なった結果は25日間の放置においても、ほぼ即日の性能を維持していた。

これに比較して、比較多層分析素子試料（No.11）は55%RH、40°C、25日間放置において大巾な劣化を示しており、特に高蛋白質濃度における劣化が著しい事が明らかである。

特許出願人 小西六写真工業株式会社

代理人弁理士 市之瀬宮夫 名古屋市天白区
志津子